

NISIN COMPOSITIONS FOR USE AS ENHANCED, BROAD RANGE BACTERICIDES.

(FI8905878)

Lantioninhaltiga bakteriocinkompositioner för användning som förbättrade baktericider med ett brett spektrum**NISIN-SAMMENSETNINGER ANVENDT SOM BREDSPEKTREDE BAKTERICIDER.
PRAEPARAT INDEHOLDENDE ET LANTHIONIN-HOLDIGT BACTERIOCIN OG ET CHELATERINGSMIDDEL**

(EP-382814)

Bacteriocin compositions comprising lanthionine containing bacteriocins and non-bactericidal agents. When the bacteriocin compositions are combined with a suitable carrier with each component present in sufficient quantities such that the composition is effective against Gram negative bacteria in addition to Gram positive bacteria, they become enhanced, rapid acting, broad range bactericides suitable for a variety of applications.

(From WO8912399 A1)

Inventor: BLACKBURN PETER
POLAK JUNE
GUSIK SARA-ANN
RUBINO STEPHEN D

Patent Assignee: AMBI INC
APPLIED MICROBIOLOGY
APPLIED MICROBIOLOGY INC
HEALTH RES INST SITY NEW YORK
NEW YORK HEALTH RES INST
STATE STREET BANK AND TRUST COMPANY
TECHVENTURE PTE LTD
UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY

Orig. Applicant/Assignee: APPLIED MICROBIOLOGY, INC.; 170 53rd Street; Brooklyn, N.Y. 11232 (US)

Patent Assignee History: (A1) NEW YORK HEALTH RES INST (US)
(B1) APPLIED MICROBIOLOGY INC (US)
(A2) APPLIED MICROBIOLOGY INC (US)
TAY, TENG-TIOW; FROM 19910211 TO 19960502
AMBI, INC.; FROM 19910211 TO 19970811
PUBLIC HEALTH RESEARCH INSTITUTE OF THE CITY OF NEW YORK, INC., THE; FROM 19910211 TO 20061215
APPLIED MICROBIOLOGY; FROM 19921006
TECHVENTURE PTE LTD; FROM 19960502
STATE STREET BANK AND TRUST COMPANY; FROM 19970811
UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY; FROM 20061215
PUBLIC HEALTH RESEARCH INSTITUTE OF THE CITY OF NEW YORK, INC., THE; FROM 19920121 TO 19921006
CITIZENS BANK OF MASSACHUSETTS; FROM 19920121 TO 20011212
APPLIED MICROBIOLOGY; FROM 19921006
AMBI, INC.; FROM 19970811 TO 19970811
STATE STREET BANK AND TRUST COMPANY; FROM 19970811 TO 20011212
PUBLIC HEALTH RESEARCH INSTITUTE OF THE CITY OF NEW YORK, INC., THE; FROM 19920417 TO 19921006
CITIZENS BANK OF MASSACHUSETTS; FROM 19920417 TO 20011212
APPLIED MICROBIOLOGY; FROM 19921006
AMBI, INC.; FROM 19970811 TO 19970811
STATE STREET BANK AND TRUST COMPANY; FROM 19970811 TO 20011212
(A1) NEW YORK HEALTH RES INST (US)
(D1) APPLIED MICROBIOLOGY INC (US)
(D1) APPLIED MICROBIOLOGY INC (US)

FamPat family	Publication Number	Kind	Publication date	Links
	FI895878	DO	19891208	
	STG: AP:	Patent application filed	1989FI-0005878 19891208	
	NO895147	DO	19891220	
	STG: AP:	Patent application filed	1989NO-0005147 19891220	
	IE940624	L	19891222	
	STG:	Abstracts		

AP : IE892015	1924IE-0009406 19890621 L 19891222	   
STG: AP : WO8912399	Abstracts 1989IE-0002015 19890621 A1 19891228	   
STG: AP : FD : NO895147	International publication with international search report 1989WO-US02625 19890616 Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] A 19891228	   
STG: AU3843089	Patent application made available to the public A 19900112	   
STG: AP : IL90700	Open to public inspection 1989AU-0038430 19890616 D0 19900118	 
STG: AP : DK45690	Patent application filed 1989IL-0090700 19890621 D0 19900221	 
STG: AP : DK45690	Patent application filed 1990DK-0000456 19900221 A 19900221	   
STG: HU893794	Patent application made available to the public D0 19900628	 
STG: AP : EP0382814	Filing application 1989HU-0003794 19890616 A1 19900822	   
STG: AP : HU53795	Application published with search report 1989EP-0907595 19890616 A2 19901228	   
STG: JP3500051	Examined patent application T 19910110	   
STG: AP : FD : HU204980	Unexam. pat appl. on foreign appl. 1989JP-0507148 19890616 Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] B 19920330	   
STG: FD : US5135910	Patent with search report Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] A 19920804	   
STG: AP : FD : FD : FD : AU631803	Patent 1991US-0653627 19910211 Continuation of: US317626 19890331 [1989US-0317626] CIP of: US209861 19880622 [1988US-0209861] Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] B2 19921210	   
STG: FD : NZ229674	Patent preceeded by A1 Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] A 19921223	   
STG: AP : FD : US5217950	Patent application 1989NZ-0229674 19890622 Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] A 19930608	   
STG: AP : FD : FD : EP0545911	Patent 1992US-0822777 19920121 Continuation of: US317626 19890301 [1989US-0317626] (Abandoned) CIP of: US209861 19880622 [1988US-0209861] (Abandoned) Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] A2 19930609	   

EP0545911	STG: AP : FD :	Application published without search report 1993EP-0200152 19890616 A3 19930728	
US5260271	STG: FD :	Search report A 19931109	
EP0382814	STG: AP : FD :	Patent 1992US-0870803 19920417 Continuation of: US317626 19890301 [1989US-0317626] (Abandoned) CIP of: US209861 19880622 [1988US-0209861] (Abandoned) Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] B1 19940216	
AT101490	STG: FD :	Patent specification Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] T 19940315	
DE68913189	STG: AP : FD :	Translation of European patent specification 1989AT-0907595 19890616 Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] D1 19940324	
DE68913189	STG: AP : FD :	Granted EP number in Bulletin 1989DE-6013189 19890616 T2 19940519	
IL90700	STG: FD :	Trans. of EP patent Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] A 19940624	
DD301912	STG: FD :	Application of patent for invention Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] A9 19940714	
IE63998	STG: AP : FD :	Doc. laid open (First publication) 1990DD-0336940 19900104 B1 19950628	
JP8009525	STG: FD :	Patent specification Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] B 19960131	
DK171069	STG: AP : FD :	Publd. examined patent applic. 1989JP-0507148 19890616 Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] B1 19960528	
NO179354	STG: FD :	Patent specification Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] B 19960617	
EP0545911	STG: FD :	Document laid open for public inspection B1 19960911	
AT142504	STG: AP : FD :	Patent specification Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] Division of: EP89907595A 19890616 [1989EP-0907595] T 19960915	
NO179354	STG: FD :	Translation of European patent specification 1993AT-0200152 19890616 Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897] C 19960925	
	STG: FD :	Patent Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-	

DE68927189	0006897] D1 19961017	  
STG:	Granted EP number in Bulletin	  
AP :	1989DE-6027189 19890616	  
DE68927189	T2 19970130	  
STG:	Trans. of EP patent	  
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]	  
FI98880	B 19970530	  
STG:	Examined application	  
FI98880	C 19970910	  
STG:	Patent	  
FD :	Technical priority: CS689789A 19891206 [1989CS-0006897]	  
IE77643	B1 19971231	  
STG:	Patent specification	  

Priority Nbr:

1988US-0209861 19880622
 1989CS-0006897 19891206
 1989EP-0907595 19890616
 1989US-0317626 19890301
 1989WO-US02625 19890616
 1991US-0653627 19910211
 1992US-0822777 19920121
 1992US-0870803 19920417

Designated States:

(WO8912399)
 AU DK FI HU JP KR MC NO SU
 European patent : AT BE CH DE FR GB IT LU NL SE

Cited Reference 2.

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報 (A)

平3-500051

⑬ 公表 平成3年(1991)1月10日

⑭ Int. Cl.⁵
A 01 N 63/00
63/02
A 23 C 3/08

識別記号

A
Z

7057-4H
7057-4H
8114-4B※

序内整理番号

審査請求 未請求
予備審査請求 未請求

部門(区分) 3 (2)

(全 14 頁)

⑭ 発明の名称 強化広域殺菌剤として使用されるナイシン組成物

⑭ 特 願 平1-507148

⑭ 翻訳文提出日 平1(1989)12月22日

⑭ ⑭ 出 願 平1(1989)6月16日

⑭ 國際出願 PCT/US89/02625

⑭ 國際公開番号 WO89/12399

⑭ 國際公開日 平1(1989)12月28日

⑭ 优先権主張 ⑭ 1988年6月22日 ⑭ 米国(US) ⑭ 209,861

⑭ 発明者 ブラックバーン ピーター

アメリカ合衆国 10036 ニューヨーク州 ニューヨーク ウエスト 44番 ストリート 426

⑭ 出願人 バブリック ヘルス リサーチ
インスティテュート オブ
ザ シティー オブ ニューヨーク

アメリカ合衆国 10016 ニューヨーク州 ニューヨーク フースト アヴェニュー 455

⑭ 代理人 弁理士 三澤 正義

⑭ 指定国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C H(広域特許), D E(広域特許), D K, F I, F R(広域特許), G B(広域特許), H U, I T(広域特許), J P, K R, L U(広域特許), M C, N L(広域特許), N O, S E(広域特許), S U

最終頁に続く

請求の範囲

1. ランチオニン含有バクテリオシンとキレート剤から成る組成物。
2. ランチオニン含有バクテリオシンと界面活性剤から成る組成物。
3. ランチオニン含有バクテリオシン、キレート剤及び界面活性剤から成る組成物。
4. 前記ランチオニン含有バクテリオシンがナイシン、サブチリン、エビデルミン、シンナマイシン、ジュラマイシン、アンコベニン及びペプ(Pep)5から成る群から選択される請求の範囲1、2又は3に記載の組成物。
5. 前記キレート剤がアルキルジアミン四酢酸、Ca EDTA、Na₂Ca EDTA、EGTA及びクエン酸塩から成る群から選択させる請求の範囲1又は3に記載の組成物。
6. 前記アルキルジアミン四酢酸がEDTAで、前記バクテリオシンがナイシンである請求の範囲5に記載の組成物。
7. 前記界面活性剤がトリトン類(Triton)、ツウィーン類(Tween)、グリセリド類、脂肪酸類、乳化剤、四価の化合物類、両性及び陰イオン性界面活性剤から成る群から選択される請求の範囲2又は3に記載の組成物。
8. 食品保存料を同様に含有する請求の範囲1に記載の組成物。

9. 担体、ランチオニン含有バクテリオシン及びキレート剤から成る強化広域殺菌剤。

10. 担体及びランチオニン含有バクテリオシン及び界面活性剤から成る強化広域殺菌剤。

11. 担体、ランチオニン含有バクテリオシン、キレート剤及び界面活性剤から成る強化広域殺菌剤。

12. ナイシン、サブチリン、エビデルミン、シンナマイシン、ジュラマイシン、アンコベニン及びペプ(Pep)5から成る群から選択されたランチオニン含有バクテリオシン及びアルキルジアミン四酢酸、EGTA及びクエン酸塩から成る群から選択されたキレート剤が、前記殺菌剤がスタフィロコッカス・オーレウス(*Staphylococcus aureus*)、ストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*)、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ(*Streptococcus agalactiae*)、コリネホルム(*Coryneform*)菌、サルモネラ・チフイムリウム(*Salmonella typhimurium*)、エスcherisia・コリ(*Escherichia coli*)、クレブシエラ・ニューモニア(*Klebsiella pneumoniae*)、シードモナス・オールギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*)、バクテリオイデス・ジンギバリス(*Bacterioides gingivalis*)及びアクチノバシラス・アクチノマイセスコミタンス(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)から成る群の細菌類の少なくともひとつに対して増強された有効性を保持する量存在する請求の範囲9、10又は11に記載の強化広域殺菌剤。

明細書

発明の名称

強化広域殺菌剤として使用される
ナイシン組成物

発明の背景

本願は、1988年6月22日付出願の第209,861号の一部継続出願である。ナイシンは、抗菌性を有するポリペプチドで、細菌ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*) の種々の株によって天然に産生される。ナイシンは、ある種のグラム陽性桿菌の芽胞成長を阻害する公知の食品保存料である。

時に間違ったり不正確な言い方で抗生物質と言われることもあるが、ナイシンはより正確にはバクテリオシン、すなわち、細菌によって産生されるタンパク質性物質でその原種に近縁の種に対してのみ抗菌活性を有するものとして分類される。ナイシンは、牛乳及びチーズ中に低濃度に見られる天然由来の保存料であり、ヒトに対し全く毒性がなくしかもアレルゲン性が皆無であると信じられている。

ナイシンは最近FDAによって、殺菌チーズスプレッド、殺菌プロセスチーズスプレッド及び果物、野菜又は肉入殺菌チーズスプレッド又は同殺菌プロセスチーズスプレッドの直接食品含有物として安全であると認められた。更に、ナイシンはポリペプチドであるので、食品中に残留するナイシン残留物は全て迅速に消化される。

ナイシンの特性についての総説は、ハースト

(Hurst) & によるアドバンシス・イン・アプライド・マイクロバイオロジー (Advances in Applied Microbiology) 21:85-123 (1981) に記載されている。この報文は、ナイシンについて一般に公知であることを記載している。ナイシンはストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*) によって産生され、アブリン&バレット社 (Apline & Barret Ltd.), ドアセット (Dorset), 英国から純粋でない調製物ニサプリン™ (Nisaprin™) として商業的に入手可能である。また、ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*) の培養物から天然のナイシンを単離しこのナイシンを公知の方法で濃縮することによって得ることもできる。別の株のストレプトコッカスを用いてナイシンを製造する方法もまた報告されている。1987年1月29日発行ゴンザレズ (Gonzalez) らによる米国特許第4,716,115号を参照。組換えDNA技術によってナイシンを製造することもまた可能なはずである。

ナイシンは、プロセスチーズ、クリーム及び牛乳のような乳製品中の保存料として効果的に用いられてきた。プロセスチーズ中におけるナイシンの使用は最近の特許の課題であった。米国特許4,584,199号及び第4,597,972号を参照。あるグラム陽性バクテリアの増殖を阻害するためのナイシンの使用については充分に実証されている。しかしながら、食品保存料としてナイシンが完全に成功し受け入れられるためには、ナイシンがグラム陰性菌及び多くのグラム陽性菌に対し無効であるという考えがこれまでその障害となってきた。

た。グラム陰性菌はほとんど常にグラム陽性菌と共存しており、食品の腐敗及び汚染の主要原因となっている。1986年4月22日発行ティラー (Taylor) の米国特許第5584199号及び1986年7月1日発行ティラー (Taylor) の米国特許第4,597,972号、ツアイ (Tsai) 及びサンディーン (Sandine) のコンジュガル・ランスファー・オブ・ナイシン・プラスミド・ジーンズ・フォーム・ストレプトコッカス・ラクティス7962・トウ・ロイコノストック・デキストラニカム181 (Conjugal Transfer of Nisin Plasmid Genes from *Streptococcus lactis* 7962 to *Lactococcus Dextranicus* 181), アプライド・エンド・エンバイメンタル・マイクロバイオロジー (Applied and Environmental Microbiology), 1987年2月, 352頁, "ア・ナチュラル・ブリザーバディンプ (A Natural Preservative)", フード・エンジニアリング・インターナショナル (Food Engineering Int'l), 1987年5月37-38頁, "フォーカス・オン・ナイシン (Focus on Nisin)", フード・マニュファクチャ (Food Manufacture), 1987年3月, 63頁を参照。

発明の要約

ナイシンから成る組成物が種々の非殺菌性薬剤と併用されると、ナイシン単独に比べてグラム陰性菌に対して強化広域殺菌活性を有しましたより広域のグラム陽性菌に対して強化活性を示すことが先の知見に反して今回見い出された。グラム陽性菌に対する強化殺菌活性は、先の知見よりも広いpH範囲で発現する。

本発明は、例えば、キレート剤又は界面活性剤のような種々の非殺菌性薬剤と併用するナイシン又は他のランチオニン含有バクテリオシン類のバクテリオシン組成物類を提供する。本発明は、更に、強化広域殺菌剤を得るために適切な担体に溶解又は懸滴した本組成物を提供する。

本発明の詳細な説明

例えばEDTAのようなキレート剤約0.1 mMから20 mMの存在下におけるナイシン約0.1 μg/mlから300 μg/mlの溶液は、ニシン単独に比べてサルモネラ・チフイムリウム(*Salmonella typhimurium*), エスcherichia・コリ(*Escherichia coli*), シュードモナス・エルギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*), バクテリオイデス・ギンギバリス(*Bacteroides gingivalis*), アクチノバチラス・アクチノマイセスコミタンス(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)及びクレブシエラ・ニューモニアエ(*Klebsiella pneumoniae*)のようなグラム陰性菌の増殖を実質的に消失させ、また、スタフィロコッカス・オーレウス(*Staphylococcus aureus*), ストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*), リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*), ストレプトコッカス・アガラクチアエ(*Streptococcus agalactiae*)及びコリネホルム(*Corynebacterium*)菌のようなグラム陽性菌に対しては更に活性であることが特に見い出された。キレート剤によるナイシン活性の増強は濃度依存性であるが、20 mMを越えるEDTA濃度は予想に反しナイシン

の殺菌活性阻害性であった。しかしながら、タンパク質性担体及び血清アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、カゼイン及びケラチンのような多価ポリマー類の存在下においては、20 mM以上のEDTA濃度によるナイシンの阻害は有意に低下し、それによってEDTAによるナイシンの強化の有用範囲が拡大された。

約0.1 μg/mlから300 μg/mlのナイシンと約0.1 mMから20 mMのキレート剤の溶液が約0.01%から1.0%の界面活性剤の存在下において、グラム陰性菌とグラム陽性菌に対するナイシンの有効性を増強することも同様に見い出された。更に、界面活性剤の存在下においてナイシンはグラム陽性菌に対する活性を増強することも見い出された。

本発明の適切なキレート剤としてEDTA、CaEDTA、CaNa₂EDTA及び他のアルキルジアミン四酢酸類、EGTA及びクエン酸塩が挙げられるが、これらに限定されるものではない。キレート剤として有用でEDTAの有無を問わずナイシンと併用する上で適切な界面活性剤として、ツヴィーン類(Tweens), トリトン類(Tritons)及びグリセリドの非イオン性界面活性剤、脂肪酸のようなイオン性界面活性剤、四価の化合物、ドテル硫酸ナトリウムのような陰イオン性界面活性剤、及びコカミドプロピルベタイン及び乳化剤のような両性界面活性剤が挙げられる。

グラム陽性菌及びグラム陰性菌はほとんど常に共存して食品中に見られるので、サルモネラ・チフイムリウム(*Salmonella typhimurium*), エスcherichia・コリ(*Escherichia coli*), シュードモナス・エルギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*), バクテリオイデス・ギンギバリス(*Bacteroides gingivalis*), アクチノバチラス・アクチノマイセスコミタンス(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)のようなグラム陰性菌及び他のグラム陰性病原菌、及びグラム陽性菌に対してナイシン組成物が有効であることは、極めて有用であろう。この殺菌剤は、生の原料、プロセス食品及び飲料の細菌性病原体及び他の腐敗性微生物菌体による汚染の管理及び防止に特に適している。食品関連用途として、特に家きんの肉、卵、チーズ及び魚肉の処理及び食品包装と処理機器の処理が挙げられる。更に、プロセスチーズ、クリーム、牛乳、乳製品などにおける食品保存料としての用途、及び家きん肉、魚肉、獣肉、野菜及び乳製品及び食品のプロセス装置の清浄における用途が挙げられる。ナイシン組成物の用途を食品関連用途だけに限定すべきではなく、このナイシン組成物はグラム陰性及びグラム陽性菌を除去する必要性又は要望があるあらゆる状況において有用であるはずである。

本組成物は例えば水溶性溶媒又は緩衝液に溶解することができ、又はいずれの適当な液体、コロイド性又はポリマー性基質中にも懸滴することができ、殺菌剤を生成する。本組成物すなわち殺菌剤は、感染治療、包帯又は外科手術用インプラント(埋入物)などの医療用途中軟膏又はコーティング剤に混合することができます。

き、また、皮膚又は口腔うがい用広域消毒剤、消毒用ブラシ、清拭剤又はローション剤として取り入れることができる。本殺菌剤は、医療器具の洗浄用、手術用術前ブラシその他において用いることができる。本殺菌剤は、周辺環境の消毒を望んでいるが腐植性又は他の毒性残留物の危険があるために化学殺菌剤が除外されているような状況において特に有用である。

複雑な有機物の存在によってその活性が低下するほとんどの広域殺菌剤と異なり、本発明の組成物は牛乳又は血清のような有機物の存在下においても殺菌剤として有効である。

ナイシンは数種の近接グラム陽性菌の増殖を最も良く阻害し、特にpH 5.0においてあるグラム陽性芽胞形成性桿菌を阻害することが公知であった。キレート剤含有ナイシン溶液の殺菌活性は極めて迅速であり、pH 5.0を超えるpH値で広域グラム陽性菌に対して本活性は増強されていた。更に、酸性及び堿基性の両pHにおいて、好適にはpH 5.0から8.0の範囲において、グラム陰性菌に対して活性化された。キレート剤により活性化されたナイシンの殺菌活性がこのように予想外にも迅速でかつ広域であることにによって、特に消毒剤としての用途に本ナイシンが適当とされている。

ナイシンは、ランチオニン含有ペプチドバクテリオシンの網に属する。この網に属するものとしてまた、サブチリン、エピデルミン、シンナマイシン、ジュラマイシン、アンコベニン及び(pep)ペプ5が挙げられ

特表平3-500051(4)

る。これらのバクテリオシンペプチドはそれぞれ異なる微生物によって産生される。しかしながら、バシリス・サブチラス (*Bacillus subtilis*) の培養物から得たサブチリン及びスタフィロコッカス・エピデルミジス (*Staphylococcus epidermidis*) の培養物から得たエピデルミジスは、ナイシンの分子構造に極めて類似の分子構造を有していることが見い出された [ハースト (Horst), 85-86頁, 及びシュネル (Schnell) ら, ネーチャ (Nature), 333: 276-278 を参照]。したがって、この分子類似性のために、他のラントオニン含有ペプチドバクテリオシン類は、グラム陰性及びグラム陽性菌汚染の除去においてキレート剤及び非イオン性界面活性剤と併用しナイシンと同等に有効である。

ナイシン及び拡大して他のラントオニン含有ペプチドバクテリオシン組成物のグラム陰性菌に対する殺菌剤としての有効性は驚異的であり、その理由として、先行技術が一般にこのナイシン活性について触れていないことが挙げられる。5.0を超えるpHにおいて

EDTA存在下におけるグラム陽性菌に対するナイシンの増強活性は、これまでナイシン活性はpH 5.0で至適であると確信されてきたので、予想外である。更に、ナイシン及びラントオニン含有ペプチドバクテリオシン組成物の殺菌剤としての有効性が発見されたことによって、広域細菌に対し有効な許容可能でかつ天然由来の無毒の物質がないことに苦慮していた食料保存科学における長期にわたる必要性が満たされる。

ナイシン、EDTA及び/又は種々の界面活性剤含有組成物のグラム陰性及びグラム陽性の両菌に対する活性が優れておりしかも予測し得なかった程迅速であることを示すために、本殺菌剤を用いていくつか試験を行った。これらの試験は例示のためのみに記載されているのであり、本発明を限定するものではない。他のラントオニン含有ペプチドバクテリオシン類はナイシンの代替物として有効であること、及びEDTA以外のキレート剤はEDTAの有効代替物であることが予測できる。

下記の実施例の試験は全て37°Cで実施した。

強化広域殺菌剤の有効性は、殺菌剤処理後の細菌生存率パーセントで殺菌剤活性を検定し求めた。一般に、標的種の懸濁液1ml当たり10⁷個の細胞をこの新規殺菌剤と一定時間インキュベート後2分間遠心分離し、細菌を集団する。この細胞ペレットから本文でファージ (F28gt) バッファと命名した救援 (レスキュード) バッファ (5.0 mM Tris-HClバッファ pH 7.8, 1 mM MgSO₄, 4 mM CaCl₂, 0.1 MNaCl及び0.1%ゼラチン) で殺菌剤を洗い去り、再懸濁後ファージバッファ中に倍数希釈し、この懸濁細菌1.00 mlを栄養寒天プレートに塗布した。37°Cで24-48時間インキュベーション後、生存細菌をコロニー形成単位 (CFU) で求めた。本発明の有効殺菌剤は、初期生存細菌数の0.1%未満しか生存させないようなものとする。

実施例 1

グラム陰性菌 (S.チフムリウム (Typhimurium))
に対するナイシン及びキレート剤の活性

表1に示したように、2.0 mM Tris (Tris), pH 8.0中で37°Cで2試験を行いナイシンとキレート剤EDTAのみを含有する殺菌剤の効果を明らかとした。試験#1は対照でEDTAを含まない条件下で実施し、グラム陰性菌 S.チフムリウム (Typhimurium) に対するナイシン単独の効果を示したものである。ナイシンの濃度上昇に伴い活性が一部発現するが、EDTAの非存在下における高濃度の活性は100 μg/mlナイシン当たり1.6%生存率であり、食品保存料として全く不適当である。ナイシン及びEDTAから得た殺菌活性のレベルは有意である。

試験#2 (表1) はナイシンと2.0 mM EDTAを用いて実施し、標的グラム陰性菌の除去においてこのナイシン組成物の優れた活性を示している。

試験#2では2.0 mM EDTAとナイシン3.0 μg/mlの濃度で殺菌剤が S.チフムリウム (Typhimurium) に対して著しい殺菌活性を示すこと、一方、100 μg/ml以上のナイシン濃度ではナイシン・EDTA殺菌剤が細菌を実質的に消失させる (生存率パーセント1.0%未満で、これはアッセイ中に全く生存殺菌がないことを示唆する)。したがって、EDTAとナイシンの併用がナイシン単独に比べて千倍を超える相乗活性を示す。

(以下余白)

試験 #	初期生存菌数 (CFU/ml)	ナイシン (μg/ml)	EDTA (μg/ml)	
			1	2
1	1.00	1.00	—	—
2	2.5	—	—	—
3	100	5.1 × 10 ⁴	—	—
4	2.5	—	—	—
5	1.00	—	—	—
6	—	—	—	—
7	—	—	—	—
8	—	—	—	—
9	—	—	—	—
10	—	—	—	—
11	—	—	—	—
12	—	—	—	—
13	—	—	—	—
14	—	—	—	—
15	—	—	—	—
16	—	—	—	—
17	—	—	—	—
18	—	—	—	—
19	—	—	—	—
20	—	—	—	—
21	—	—	—	—
22	—	—	—	—
23	—	—	—	—
24	—	—	—	—
25	—	—	—	—
26	—	—	—	—
27	—	—	—	—
28	—	—	—	—
29	—	—	—	—
30	—	—	—	—
31	—	—	—	—
32	—	—	—	—
33	—	—	—	—
34	—	—	—	—
35	—	—	—	—
36	—	—	—	—
37	—	—	—	—
38	—	—	—	—
39	—	—	—	—
40	—	—	—	—
41	—	—	—	—
42	—	—	—	—
43	—	—	—	—
44	—	—	—	—
45	—	—	—	—
46	—	—	—	—
47	—	—	—	—
48	—	—	—	—
49	—	—	—	—
50	—	—	—	—
51	—	—	—	—
52	—	—	—	—
53	—	—	—	—
54	—	—	—	—
55	—	—	—	—
56	—	—	—	—
57	—	—	—	—
58	—	—	—	—
59	—	—	—	—
60	—	—	—	—
61	—	—	—	—
62	—	—	—	—
63	—	—	—	—
64	—	—	—	—
65	—	—	—	—
66	—	—	—	—
67	—	—	—	—
68	—	—	—	—
69	—	—	—	—
70	—	—	—	—
71	—	—	—	—
72	—	—	—	—
73	—	—	—	—
74	—	—	—	—
75	—	—	—	—
76	—	—	—	—
77	—	—	—	—
78	—	—	—	—
79	—	—	—	—
80	—	—	—	—
81	—	—	—	—
82	—	—	—	—
83	—	—	—	—
84	—	—	—	—
85	—	—	—	—
86	—	—	—	—
87	—	—	—	—
88	—	—	—	—
89	—	—	—	—
90	—	—	—	—
91	—	—	—	—
92	—	—	—	—
93	—	—	—	—
94	—	—	—	—
95	—	—	—	—
96	—	—	—	—
97	—	—	—	—
98	—	—	—	—
99	—	—	—	—
100	—	—	—	—
101	—	—	—	—
102	—	—	—	—
103	—	—	—	—
104	—	—	—	—
105	—	—	—	—
106	—	—	—	—
107	—	—	—	—
108	—	—	—	—
109	—	—	—	—
110	—	—	—	—
111	—	—	—	—
112	—	—	—	—
113	—	—	—	—
114	—	—	—	—
115	—	—	—	—
116	—	—	—	—
117	—	—	—	—
118	—	—	—	—
119	—	—	—	—
120	—	—	—	—
121	—	—	—	—
122	—	—	—	—
123	—	—	—	—
124	—	—	—	—
125	—	—	—	—
126	—	—	—	—
127	—	—	—	—
128	—	—	—	—
129	—	—	—	—
130	—	—	—	—
131	—	—	—	—
132	—	—	—	—
133	—	—	—	—
134	—	—	—	—
135	—	—	—	—
136	—	—	—	—
137	—	—	—	—
138	—	—	—	—
139	—	—	—	—
140	—	—	—	—
141	—	—	—	—
142	—	—	—	—
143	—	—	—	—
144	—	—	—	—
145	—	—	—	—
146	—	—	—	—
147	—	—	—	—
148	—	—	—	—
149	—	—	—	—
150	—	—	—	—
151	—	—	—	—
152	—	—	—	—
153	—	—	—	—
154	—	—	—	—
155	—	—	—	—
156	—	—	—	—
157	—	—	—	—
158	—	—	—	—
159	—	—	—	—
160	—	—	—	—
161	—	—	—	—
162	—	—	—	—
163	—	—	—	—
164	—	—	—	—
165	—	—	—	—
166	—	—	—	—
167	—	—	—	—
168	—	—	—	—
169	—	—	—	—
170	—	—	—	—
171	—	—	—	—
172	—	—	—	—
173	—	—	—	—
174	—	—	—	—
175	—	—	—	—
176	—	—	—	—
177	—	—	—	—
178	—	—	—	—
179	—	—	—	—
180	—	—	—	—
181	—	—	—	—
182	—	—	—	—
183	—	—	—	—
184	—	—	—	—
185	—	—	—	—
186	—	—	—	—
187	—	—	—	—
188	—	—	—	—
189	—	—	—	—
190	—	—	—	—
191	—	—	—	—
192	—	—	—	—
193	—	—	—	—
194	—	—	—	—
195	—	—	—	—
196	—	—	—	—
197	—	—	—	—
198	—	—	—	—
199	—	—	—	—
200	—	—	—	—
201	—	—	—	—
202	—	—	—	—
203	—	—	—	—
204	—	—	—	—
205	—	—	—	—
206	—	—	—	—
207	—	—	—	—
208	—	—	—	—
209	—	—	—	—
210	—	—	—	—
211	—	—	—	—
212	—	—	—	—
213	—	—	—	—
214	—	—	—	—
215	—	—	—	—
216	—	—	—	—
217	—	—	—	—
218	—	—	—	—
219	—	—	—	—
220	—	—	—	—
221	—	—	—	—
222	—	—	—	—
223	—	—	—	—
224	—	—	—	—
225	—	—	—	—
226	—	—	—	—
227	—	—	—	—
228	—	—	—	—
229	—	—	—	—
230	—	—	—	—
231	—	—	—	—
232	—	—	—	—
233	—	—	—	—
234	—	—	—	—
235	—	—	—	—
236	—	—	—	—
237	—	—	—	—
238	—	—	—	—
239	—	—	—	—
240	—	—	—	—
241	—	—	—	—
242	—	—	—	—
243	—	—	—	—
244	—	—	—	—
245	—	—	—	—
246	—	—	—	—
247	—	—	—	—
248	—	—	—	—
249	—	—	—	—
250	—	—	—	—
251	—	—	—	—
252	—	—	—	—
253	—	—	—	—
254	—	—	—	—

実施例 2

グラム陰性菌 (S. チフィムリウム
(*typhimurium*)) に対するナイシン。

キレート剤及び界面活性剤の活性

4つの試験 (表2) はナイシン及びEDTAと界面活性剤トリトン (Triton) X-100の双方を含有する殺菌剤の37℃, 20mMトリス (Tris), pH 8.0中におけるS. チフィムリウム (*typhimurium*) の効果を調べた。対照 (試験#1) は、実施例1の対照と同じである (表1)。

試験#2 (表2) は、ナイシンと1.0%トリトン (Triton) X-100を用いて行ったが、EDTAを用いなかった。この洗浄剤が存在しているだけでグラム陰性菌に対するナイシンの活性は阻害されナイシンは無効であった。しかし、本発明を説明する試験#3と#4ではトリトン (Triton) X-100と併用して20mM EDTAが存在することが、S. チフィムリウム (*typhimurium*) に対するナイシンの殺菌活性を著しく増強するひとつの殺菌剤となる。実際、トリトン (Triton) X-100とEDTAの併用でナイシンを含有しない場合でも有効であった。但し、ナイシンの存在下における場合よりもその度合は弱かった。#3と#4の両試験で (表2) ナイシン併用剤は極めて有効であったが、1.0%トリトン (Triton) X-100の濃度 (試験#4, 表2) が最も有効であった。

EDTAと併用して非イオン性界面活性剤トリトン (Triton) X-100が存在することによって、ナイシ

ンとEDTAのみを含有する殺菌剤よりもはるかに強くグラム陰性菌に対するナイシンの活性が増強される (実施例1)。

(以下余白)

試験#	初期生存細胞数	EDTA (mM)	Triton X-100 (%)	抑制率 (%)			
				0	10	30	50
1	1.0 × 10 ⁶	0	0	100	37.4	17.4	10.0
2	1.0 × 10 ⁶	0	1.0	100	37.4	17.4	10.0
3	1.0 × 10 ⁶	20	0.1	100	37.4	17.4	10.0
4	1.0 × 10 ⁶	20	1.0	100	37.4	17.4	10.0

実施例 3

グラム陰性菌 (S. チフィムリウム
(*typhimurium*)) に対するナイシン。

キレート剤及び界面活性剤の活性

表3は、37℃の20mMトリス (Tris), pH 8.0中におけるナイシン、キレート剤EDTA 20mM及び非イオン性界面活性剤ツヴィーン (Tween) 20含有殺菌剤のS. チフィムリウム (*typhimurium*) に対する活性の増強を示したものである。トリトン (Triton) X-100併用の場合と同じく (実施例2)、ナイシンとEDTAを (1%) ツヴィーン (Tween) 20と併用することは最も有効である。

(以下余白)

実施例 4

グラム陰性菌 (エスシェリシア・コリ (Escherichia coli)) に対するナイシン、キレート剤及び界面活性剤の活性

ナイシン及びEDTA含有殺菌剤のグラム陰性菌 E. コリ (Coli) に対する殺菌剤の効果を明らかとし、表4に示した。

表4

試験 #	初期生存 細胞数 (cfu)	EDTA (mM)	ナイシン ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	37°C 2時間における生存率(%)			
				0	30	100	300
1	1.0×10^7	0	0	100	27	25	8.5
2	1.0×10^7	20	0	14.5	0.86	0.01	0.001
3	1.0×10^7	0	1.0	100	-	30	-
4	1.0×10^7	20	1.0	1.2	0.8	0.05	$<10^{-4}$

37°Cの20mMトリス(Tris)バッファ溶液、pH 8.0中で初期生存数を 1×10^7 個 E. コリ (Coli)細胞/ ml とし試験を行った。EDTAを含有した場合と含有しない場合がある。殺菌剤の効果は、2時間後の細菌生存率パーセントの閾値として求めた。

試験#1(対照、表4)ではEDTAを含有せず、ナイシンはE. コリ (Coli)の除去に対してほとんど有意の活性を示さなかった。しかし、20mM EDTAが存在する試験#2(表4)では、殺菌剤の効果は、2時間後においても依然として示された。ナイシン濃度の上昇に伴い本活性の有効性は増大した。

表5

試験 #	初期生存 細胞数 (cfu)	EDTA (mM)	ナイシン ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	2時間における生存率(%)			
				0	30	100	300
1	10^7	0	0	100	-	58	38
2	10^7	20	0	22	0.5	1.1	0.085

EDTA使用試験を1回、非使用試験を1回、2回の試験を37°Cの20mMトリス(Tris)バッファ、pH 8.0中で初期生存 K. ニューモニアエ (pneumoniae)細胞数を 10^7 個/ ml とし行った。本効果を2時間後の細胞生存率%の閾値として測定した。

EDTA非使用試験#1(対照、表5)で、ナイシンはK. ニューモニアエ (pneumoniae)に対する活性をほとんど示さなかった。しかし、試験#2(表5)においては20mM EDTAが存在し、本殺菌剤はK. ニューモニアエ (pneumoniae)に対する活性を示した。ナイシン濃度が上昇するに伴い本活性の有効性が高まった。

実施例 6

グラム陰性菌 (サルモネラ・チフミリウム (Salmonella typhimurium)) に対するナイシン活性はキレート剤濃度に依存性である。

表6のデータは、グラム陰性菌 (S. チフミリウム (typhimurium)) に対するナイシンの増強活性化は、50mM酢酸ナトリウム、pH 5.0又は20mMトリス(Tris)、pH 8.0中のいずれかにおいて37°CでED

殺菌剤としてのナイシンとEDTAの併用は、E. コリ (Coli)に対する有効性を千倍も相乗的に高めることが明らかである。試験#3と#4(表4)から、トリトン(Triton)X-100がE. コリ (Coli)に対する有効性を全く有していないことがわかる。実際、トリトン(Triton)X-100は、S. チフミリウム (typhimurium)でみられたと同様に(表2)グラム陰性菌に対するナイシン活性を阻害するようである。しかし、表2と4からわかるように、EDTAによるナイシンの全般的な増強はトリトン(Triton X-100)の阻害効果を実質的に打消す。

ナイシン及びEDTAのようなキレート剤1種を含有する殺菌剤は、界面活性剤の存在下においても有効性を示す。しかし、表2と4からわかるように、EDTAによるナイシンの全般的な増強はトリトン(Triton X-100)の阻害効果を実質的に打消す。

ナイシン及びEDTAのようなキレート剤1種を含有する殺菌剤は、界面活性剤の存在下においても有効性を示す。

ナイシン及びEDTAのみを含有する殺菌剤のグラム陰性菌 K. ニューモニアエ (pneumoniae)に対する効果が、表5に示したように明らかとなった。

(以下余白)

TA濃度に依存性であることを示している。

ナイシンを使用せず100mMまでのEDTA濃度を用いた試験#1と#3(対照、表6)では、pH5.0(#1)又はpH8.0(#3)のいずれかにおいてS.チフイムリウム(*typhimurium*)に対し有意味の活性をほとんど示さなかった。しかし試験#2及び#4(表6)では、ナイシン100μg/mlがEDTAと共存しており、本殺菌剤はS.チフイムリウム(*typhimurium*)に対し実質的な活性を発現した。この殺菌剤の活性は酸性pH(5.0)でも塩基性pH(8.0)でも双方において同様であったが、このことは、ナイシン単独のグラム陽性菌に対する活性がpH5.0で至適であるという事実に反していた。

EDTAによるナイシンの増強は、濃度依存性であり、pH値5.0及び8.0において0.2mMから10mMの範囲で至適となる。10mM EDTAを超える濃度においてEDTAによるナイシンの増強が低下するのは驚くべきことである。活性化の低下は、pH5.0よりもpH8.0で有意に著明である。

(以下余白)

試験#	pH	ナイシン μg/ml	EDTA(μM)						2時間生存細胞数	初期生存細胞数	倍率
			0	0.2	2.0	10	50	100			
6	5.0	0	100	-	38.7	15.2	3.5	-	-	-	-
		100	0.6	10 ⁻¹	10 ⁻¹	0.004	0.02	-	-	-	-
	8.0	0	100	-	5.7	14	11.1	4.5	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹
		100	0	100	-	10 ⁻¹					
		100	0	100	-	10 ⁻¹					

実施例7

グラム陰性菌(S.チフムリウム(*typhimurium*))に対するナイシン及びキレート剤

EDTAによる生体組織存在下グラム陰性菌に対するナイシン活性の増強が、ニワトリの筋肉上のS.チフイムリウム(*typhimurium*)で明らかとなり、表7に示した。

インキュベーションは、pH5.0の50mM酢酸ナトリウム又はpH8.0の20mMトリス(Tris)中のいずれか中で37℃で行った。

さいの目にしたニワトリ筋肉を使用に先立ち次亜塩素酸ナトリウム及びボビドンショウ素で洗浄した。本組織に接種するために、さいの目にしたニワトリ筋肉をpH8.0の20mMトリス塩酸中S.チフイムリウム(*typhimurium*)懸濁液10⁸個細胞/ml中に浸漬した。過剰の水分は、浸漬立方体から振り落として除去した。ニワトリ試料は、本組織を覆うために充分な量のナイシン組成物含有パッファ中に入れ37℃で2時間インキュベートした後、本組織を覆うために充分な量のファージ(phage)パッファに本組織を移した。試験溶液中に残留する細胞を遠心分離によって集菌後ファージ(phage)パッファで洗浄し、ファージパッファによって組織から洗い出された細胞と合わせた。合わせた試料(“非固着”細胞と命名)を倍数希釈し、アリコット100μlを生存細菌の測定のために塗布した。

ナイシン非存在下pH5又はpH8のいずれいかに

おける試験#1及び試験#3(表7)において、EDTA単独ではS.チフムリウム(*typhimurium*)の生存に有意の効果を全く示さない。しかし、ナイシン300μg/mlが存在する試験#2と#4(表7)では、ニワトリ筋肉上のS.チフイムリウム(*typhimurium*)に対しpH5.0及びpH8.0の両pHで本殺菌剤は実質的活性を示した。

EDTAによるナイシンの増強は濃度依存性であり、pH値5.0及び8.0の両値で0.3mMから10mM EDTAの範囲に至適濃度があった。pH8.0において10mM EDTAを超える濃度では、EDTAによるナイシンの活性化が低下する。しかし、試験#5に示したように(表7)，pH8.0において1.0%ウシ血清アルブミンの存在下では、ニワトリ筋肉上のS.チフイムリウム(*typhimurium*)に対するナイシンの有効性が100mMまでのEDTA濃度範囲で示される。

以上の如く、ナイシン及び0.1mMから20mMの範囲のEDTAのような低濃度のキレート剤含有殺菌剤は、グラム陰性菌による食品汚染の除去又は防止に極めて有効であり得る。

(以下余白)

実施例 8

グラム陰性菌 (S. チフイムリウム (typhimurium))
に対するナイシン活性の滴定

キレート剤の至適濃度下におけるトリス (Tris) バッファ中本殺菌剤のグラム陰性菌に対する有効性が実質的であることを明らかにし、表 8 に示した。

試験 # 2 から、1%ウシ血清アルブミン (B S A) 存在下 20 mM トリス (Tris), pH 8.0 中 1.0 mM EDTA を含む 0.3 μ g/ml ほどのわずかな量のナイシンが、S. チフイムリウム (typhimurium) の生存を有意に低下することがわかる。本殺菌剤は、ナイシン単独がグラム陽性ストレプトコッジ (Streptococcus) に対し活性であるように、グラム陰性菌に対し活性である。

(以下余白)

表7

試験 #	EDTA μg/ml	EDTA (mM)									
		1	0.1	0.3	1.0	3.0	10	30	100	200	111.8
1	5.0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	5.0	300	0.1	0.2	0.05	0.01	0.001	0.016	0.031	0.02	0.07
3	4.0	0	100	-	-	-	-	-	-	-	-
4	3.0	300	7.5	0.1	0.02	0.02	0.03	0.17	0.5	-	-
5	4.0	300	7.5	0.1	0.02	0.02	0.03	0.17	0.5	-	-
6	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
7	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
8	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
9	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
10	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
11	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
12	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
13	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
14	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
15	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
16	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
17	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
18	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
19	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
20	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
21	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
22	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
23	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
24	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
25	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
26	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
27	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
28	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
29	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
30	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
31	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
32	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
33	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
34	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
35	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
36	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
37	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
38	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
39	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
40	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
41	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
42	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
43	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
44	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
45	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
46	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
47	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
48	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
49	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
50	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
51	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
52	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
53	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
54	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
55	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
56	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
57	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
58	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
59	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
60	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
61	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
62	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
63	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
64	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
65	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
66	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
67	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
68	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
69	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
70	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
71	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
72	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
73	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
74	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
75	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
76	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
77	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
78	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
79	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
80	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
81	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
82	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
83	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
84	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
85	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
86	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
87	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
88	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0 ⁻⁴	0.004	0.001	0.01	0.03	0.04
89	4.0	300	0.02	0.03	0.002	<1.0<					

実施例 10

グラム陰性菌 [S. チフィムリウム (*typhimurium*)]
に対するナイシン E D T A 及び
メチルバラベン活性

ナイシン及びE D T A 含有殺菌剤を公知の食品保存料メチルバラベンと併用すると、グラム陰性菌に対しづばぬけて有効であることが明らかとなり、表 10 に示した。

さいの目にしたニワトリ筋肉を次亜塩素酸ナトリウム及びボビドンヨウ素で使用に先立ち洗浄した。本組織に接種するため、さいの目にしたニワトリの筋肉をp H 5.0 の 5.0 mM 酢酸ナトリウムバッファ中 1.0 × 10⁷ 個細胞/ml の S. チフィムリウム (*typhimurium*) 懸濁液に浸漬した。過剰の水分を振り落して浸漬立方体から除去した。本組織を覆うために充分な量のナイシン組成物含有バッファ中に本組織を入れ、37℃で2時間インキュベート後、本組織を覆うために充分な量のファージ (phage) バッファに移した。試験溶液中に残留する細菌を遠心分離によって集菌後ファージ (phage) バッファで洗浄し、ファージバッファによって本組織から洗い出された細菌と合わせた。合わせた試料 ("非固着" 細胞と命名) を倍数希釈し、アリコット 1.00 μl を生存細胞の測定のために塗布した。

試験 #1 (表 10) では、1.0 mM E D T A の存在下メチルバラベンは、1.0% の濃度においてのみ S. チフィムリウム (*typhimurium*) に対し効果的であることが示された。しかし、試験 #2 (表 10) では、

表 9

試験 #	初期生存 細胞数	EDTA (mM)	ナイシン (μg/ml)	2時間生存率 (%)			
				0	10	100	200
1	8.0	3 × 10 ⁷	0	0	100	-	-
2	4.0	3 × 10 ⁷	1.0	1.0	27	0.26	0.003

300 μg/ ml ナイシンの存在下におけるメチルバラベンとナイシンの S. チフィムリウム (*typhimurium*) に対する有効性は実質的に改良された。

ナイシン及びE D T A 含有組成物は、食品保存料メチルバラベンの有用性を有意に向上させた。更に、本殺菌剤は、メチルバラベンのような一般に広く認められてはいるが好適性に劣る食品保存料の (使用の) 集中を実質的に低下させることになるか、又はそれらに対する需要を消失させることになる。

(以下余白)

表 10

試験 #	初期生存 細胞数	ナイシン (μg/ml)	EDTA (mM)	2時間生存率 (%)			
				0	0.1	1.0	10
1	4 × 10 ⁶	0	0	11.1	1.0	1.0	1.0
2	3 × 10 ⁶	300	10	0.03	<1.0 ^a	<1.0 ^a	<1.0 ^a

^a 50時間生存率が 66.77, pH 5.0

参考文献

特表平3-500051(10)

実施例 1.1

グラム陽性菌 (*Staphylococcus aureus* (スマ
フィロコッカス・オウレウス)) に対するナイシン及
びキレート剤の活性

キレート剤によるナイシンの活性化は pH 依存性である。表 1.1 のデータは、pH 8.0においてよりも pH 5.0においてナイシンが *S. オウレウス (aureus)* に対し殺菌性が強くなることを確認したものである。pH 5.0において EDTA は *S. オウレウス (aureus)* に対しナイシン活性を増強しないが、1.0 mMを超える EDTA 濃度においてはナイシンの殺菌活性に阻害性となる。しかし、pH 8.0における EDTA 活性化ナイシンの殺菌活性はナイシン単独又は pH 5.0 の EDTA と併用した時よりも有意に高い。

ナイシン単独の殺菌活性は、pH 5.0 以下で最大となると報告されており (ハースト (Hurst) 参照)、表 1.1 に示すデータはこれを裏付けるものである。本知見に基づき、*S. オウレウス (aureus)* に対する EDTA のナイシン活性化はより低い pH で同様に最大になると考えられてきた。しかし、表 1.1 でわかるようにまた予測に反して (表 6 参照)、EDTA が pH 5.0 においてグラム陽性菌に対するナイシン活性を増強することは観察されなかった。しかし、EDTA 高濃度によるナイシン活性の阻害は pH 5.0 においてもまだ認められた。従って、キレート剤によるナイシン活性化はある濃度範囲のキレート剤においてのみ

起こり、グラム陽性菌に関しては pH 5.0 を超える好適な pH 範囲の pH に依存性である。

(以下余白)

表 1.1

スマフィロコッカスオウレウスに対するナイシン殺
菌活性に及ぼす EDTA の効果における pH の影響

pH ナイシン M/L	EDTA mM							殺菌活性 (%)
	0	0.1	0.4	1.0	3.0	10	100	
6.0	100	-	100	100	100	100	100	-
4.0	7.4	0.43	0.91	0.2	0.4	3	55	-
5.0	0	100	-	-	100	-	-	-
5.0	3.0	0.6	1.0	1.3	1.4	1.8	34	100

a 菌数生存率: 1.0×10^6 CFU/ml

b インキュベーション pH 5.0 の時間: 177 分
20 mM EDTA 濃度: 0.77 mM EDTA

実施例 1.2

グラム陽性菌に対するナイシン及びキレート剤活性

ナイシン殺菌活性に及ぼす EDTA の pH 8.0 における効果は、重要ヒト病原体の 1 種である *S. オウレウス (aureus)* に限定されておらず、歯垢の原因であるストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*) (表 1.2 A)、食物運搬病原体の 1 種リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) (表 1.2 B)、及び体臭の寄与因子であるコリネホルム (*Corynebacterium*) 従属細菌類の混合群 (表 1.2 C) でも観察されている。

(以下余白)

表12A
ストレプトコッカス・ミュータンスに対する
ナイシンの殺菌活性に及ぼすEDTAの効果

pH μg/ml	EDTA μM					
	0	0.1	0.3	1.0	3.0	10
2時間後：生存率						
8.0 0	100	-	4.6	3.6	8	36
8.0 3	0.22	0.03	0.0009	0.1	-	0.16

a 初期生存率: 1.0×10^6 cfu/ml
b $1/24$ 時間後: 0.020mM EDTAを添加した。

表12C
コリネホルム菌に対するナイシン
殺菌活性に及ぼすEDTAの効果

pH μg/ml	EDTA μM					
	0	0.1	0.3	1.0	3.0	10
2時間後：生存率						
8.0 0	100	-	4.6	3.6	8	36
8.0 3	0.22	0.03	0.0009	0.1	-	0.16

a 初期生存率: 1.0×10^6 cfu/ml
b $1/24$ 時間後: 0.020mM EDTAを添加した。

表12B
リスチリア・モノサイトゲネスに対する
殺菌活性に及ぼすEDTAの効果

pH μg/ml	EDTA μM					
	0	0.1	0.3	1.0	3.0	10
2時間後：生存率						
8.0 0	100	-	-	-	-	-
8.0 3	0.71	0.04	0.04	0.02	0.1	0.64

a 初期生存率: 6.0×10^6 cfu/ml
b $1/24$ 時間後: 0.020mM EDTAを添加した。

実施例 1.3

キレート剤活性化ナイシンの迅速殺菌活性

EDTA含有ナイシンから成る殺菌剤は、表13Aに示したデータによって例示されるように殺菌性が迅速である。10⁷個細胞/mlのグラム陽性菌 *S. ミュータンス (mutans)* 懸濁液をpH 7.3の2.0 mMトリス (Tris) バッファ中である範囲の濃度の1 mM EDTA活性化ナイシンと37℃でインキュベートした。この懸濁液は0.5分から60分の範囲の種々の時間にわたり前記殺菌剤とインキュベートした。本殺菌剤の殺菌剤としての有効性を生存細菌のパーセントを求ることによって推定した。EDTAによって増強されたナイシンはこの処方ににおいて10 μg/mlの少量で、1分間以内に6対数倍盛だけ細胞数を減少させることができる。

迅速な殺菌活性は、有効消毒のための前提条件である。従って、本組成物は特に本文で明らかとしたように、口腔洗浄剤、うがい薬、歯みがき粉又は歯垢形成 *S. ミュータンス (mutans)* に有効な他類似歯科用品 (dentalfice) の成分として有効な殺菌剤であることが予測される。

EDTA増強ナイシンのグラム陰性菌に対する2-3時間後の活性を実施例1-7に示した。EDTA増強ナイシンの迅速殺菌活性は、同様にグラム陰性菌に対しても見られ、このことは表13Bのデータによても例示される。

(以下余白)

表13A

EDTAによる増強ナイシンのストレプトコッカス
・ミュータンスに対する殺菌活性動態

インキュベーション 時間 (分)	1.0mM EDTA含有ナイシン $\mu\text{g}/\text{ml}$					
	0	1	3	10	30	100
生存率%						
0.5	-	-	-	-	-	$<10^{-4}$
1	-	-	-	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$
3	100	0.5	0.002	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	-
15	-	0.03	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	-	-
30	-	-	$<10^{-4}$	-	-	-
60	100	0.003	-	-	-	-

a 分生菌数: 1.0×10^7 cfu/ml
インキュベーションpH7.3の20mMリバスト37°Cで行った。

表13B
EDTAによる増強ナイシンのエヌシェリヒア
・コリに対する迅速殺菌活性

EDTA mM	1分間生存率%					
	0	0.3	1.0	3	10	30
1.0	100	100	56	37	33	33

1分間生存率: 1.0×10^7 cfu/ml
EDTA濃度pH7.3の20mMリバスト37°Cで行った。

実施例14

ナイシン活性のEDTA増強に及ぼす二価カチオンの効果

二価のカチオンはEDTA及び他のキレート剤に結合し、EDTAによるナイシンの活性化を中和すると予測される。しかし、表14のデータによってわかるように、*S. ミュータンス* (*S. mutans*)に対するナイシンの殺菌活性は、1 mMのCa²⁺イオンの存在下においてさえも1 mM EDTAによって増強される。3 mMを超えた場合にのみ、Ca²⁺イオンはEDTA活性化ナイシンに阻害性であった。これは特に、カルシウムイオン濃度が関連する口腔洗浄外用剤において重要である。

(以下余白)

表14
二価のカチオン存在下における
ストレプトコッカスミュータンスに
対するEDTA活性化ナイシンの迅速殺菌活性

CaCl ₂ mM	1分間生存率%					
	0	0.1	1.0	3	10	100
0	100	-	-	-	-	-
1	2.9	-	-	-	-	-
3 ^a	0.0042	0.0042	0.0052	-	-	18
10 ^a	0.0019	-	0.0003	0.0004	0.0005	6.8
100 ^a	$<10^{-4}$	-	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	0.0001	1.5

EDTA mM
a 分生菌数: 1.0×10^7 cfu/ml
インキュベーションpH7.3の20mMリバスト37°Cで行った。

特表平3-500051(13)

実施例 15

グラム陽性菌に対するナイシン及び界面活性剤活性

ナイシンの殺菌活性は、界面活性剤1種のみと併用した時も同様に有意に増強される。このことは、表15Aに示したようにある限られたナイシン濃度(0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で最も良く示される。0.1%までの濃度において食品等級の界面活性剤モノラウリンは、複合媒体牛乳中のストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*)に対し有意の殺菌活性をほとんど示さなかった。ナイシンは0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの濃度において同様に牛乳中において有意の殺菌活性を示さなかった。しかし、0.1%モノラウリンと0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のナイシンの2薬剤の併用は、S.アガラクチアエ (*agalactiae*)に対し極めて強力である。この殺菌剤は、相加効果で期待されるよりも百倍以上強力であり、上記薬剤のいずれかを単独で用いる時よりも1万倍強力である。従って、ナイシンの適用をその使用可能な活性に限定する時、界面活性剤1種を含有するナイシンから成る殺菌剤はさらに有用であると期待できる。

ナイシンの適用をその有効活性に限定した例を表15Bのデータによって示した。ナイシン及び特にナイシンとEDTAから成る殺菌剤はL.モノサイトゲネス (*monocytogenes*)に対して殺菌性であるが、表15Bのデータは、牛乳のような複合媒体においてこの有機物に対する有効なナイシン活性が制約を受け

ることを示している。しかし、グリセリドのモノオレートとナイシンから成る殺菌剤はこの食物連携病原体に対して牛乳中においても有効である。但し、モノオレート自体はこの有機物に対し全く殺菌性を有していない。

(以下余白)

表15A

牛乳中ストレプトコッカスアガラクチアエに対する37°Cにおけるナイシン殺菌活性
(モノラウリンによるナイシンの活性化)

ナイシン ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	モノラウリン		
	0	0.01	0.1
2時間後における生存率%			
0	100	100	4.5
0.02	100	100	0.2
0.2	2.2	0.95	0.0008

a 初期生存数: 6.0×10^7 cfu/ml
インキュベーションは37°Cの牛乳中で行った。

表15B

37°Cの牛乳中リステリア モノサイトゲネスに対するナイシンの殺菌活性
(モノオレートによるナイシンの活性化)

ナイシン ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	モノレート%		
	0	0.1	1.0
2時間後の生存率%			
0	100	67	63
100	0.56	10^{-3}	10^{-4}

a 初期生存数: 5.0×10^7 cfu/ml
インキュベーションは37°Cの牛乳中で行った。

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB-A- 738655		None	

For more details about this paper, see Official Journal of the European Patent Office, No. 19/1992

第1頁の続き

⑤Int. Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号
A 23 C	13/10	8114-4B
	19/11	8114-4B
A 23 L	3/3526	6977-4B
C 11 D	3/48	7614-4H
II A 61 K	7/16	7252-4C

優先權主張 ②1989年3月1日③米國(U.S.)④317,626

◎森 明 考 ボラソク ジューン

アメリカ合衆国 11201 ニューヨーク州 ブルックリン モンタ
ギー フォートリート 57

◎登　門　著　吉シシタ　井ラニアン

アメリカ合衆国 10003 ニューヨーク州 ニューヨーク フース
スト アヴェニュー 317

◎著者 ルビーノ・ステファン・ディ

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ハリソン ヘンリー アヴェニ
ュー 111